溶磷菌溶磷效率特性之評估

徐妤瑄 [1]、黃政華 [2,*]

摘要

磷肥常為影響作物產量的重要因子之一，作物接種溶磷菌常作為提高作物磷吸收的策略，故商品化的溶磷菌肥料已因應市場而產生。本研究計畫目的在於評估本研究主要探討培養基種類對溶磷菌溶磷活性和有機酸分泌的影響，並評估 4 種市售溶磷菌肥料對促進莧菜生長和磷吸收的效應。本研究使用 12 株菌株和 4 種溶磷培養基，培養基包含 AFS3183-1 培養基 (蔗糖或葡萄糖)、NBRIP 及 Pikovskaya's medium (PVK)，以評估培養基對溶磷活性、培養基 pH、菌數落和有機酸分泌量的影響。盆栽試驗使用鹼性和酸性土壤，鹼性土壤施用之商品化溶磷菌肥料為 PSB2 和 PSB3，酸性土壤施用之溶磷菌肥料為 PSB1 和 PSB4，分別探討溶磷菌肥料對莧菜生長和磷吸收的影響。結果顯示，培養基種類顯著影響溶磷菌之溶磷活性，供試菌株中以 *Pseudomonas grimontii* CHB 1107 之溶磷活性為最高，其培養於 AFS3183-1 以葡萄糖為碳源之溶磷活性達 7946 μg/mL/day。整體而言，溶磷菌培養於 PVK 培養基之溶磷活性顯著高於培養於其他培養基者，其可能由於 PVK 培養基所含的養分較高有關，且僅此培養基含酵母抽出物。培養基之 pH 與溶磷活性呈顯著負相關 ($r = -0.75$, $P < 0.0001$)，顯示酸性環境有助於培養基中磷酸三鈣之溶解。培養基種類顯著影響溶磷菌菌株分泌有機酸的種類和濃度，供試菌株分泌之有機酸濃度以 2-ketogluconic acid、gluconic acid 及 pyruvic acid 為較高，且溶磷菌分泌此三種酸的濃度與溶磷活性呈顯著負相關，其中 2-ketogluconic acid 有最高之相關係數達 0.66。盆栽試驗顯示，半量化學肥料+PSB3 和半量化學肥料+滅菌 PSB3 之莧菜植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 125-140%。然而，等量 PSB3 化學肥料處理之植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 83.6%，顯示該溶磷菌肥料中

* 通訊作者：chhuang@nchu.edu.tw
[1] 國立中興大學土壤環境科學系碩士班學生。台灣。台中市。
[2] 國立中興大學土壤環境科學系副教授。台灣。台中市。

所含養分的效應遠大於溶磷菌本身促進植株生長之效應。相反的，半量化學肥料+PSB2 和半量化學肥料+滅菌之 PSB2 並未顯著促進植株生長。半量化學肥料+PSB3 處理和半量化學肥料+滅菌 PSB3 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料者達 54.8-73.9%，但等量 PSB3 化學肥料處理之植株磷吸收量亦顯著高於半量化學肥料者達 41.0%，顯示該溶磷菌肥料中所含的磷肥可能為顯著增加植株磷吸收量之主要原因。然而，半量化學肥料+PSB2 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料+滅菌之 PSB2 達 38.0%，顯示此溶磷菌肥料可顯著增加植株磷吸收量。與半量化學肥料相較，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB4 皆顯著降低莧菜植株乾重。此外，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB4 皆未能顯著增加磷吸收量，顯示酸性土壤施用溶磷菌肥料促進莧菜生長和磷吸收之效益較低。培養基種類影響溶磷菌之溶磷活性分析，商品化溶磷菌功效不一，而原料中養分含量可能顯著影響其肥功效。

關鍵詞：磷肥、溶磷菌、微生物肥料。

前言

磷是植物生長所需的巨量養分之一，其佔植體乾重約 0.2%，但磷常為限制植物生長的養分 (Alori *et al*. 2017)。一般而言，土壤的總磷含量約為 0.05% (w/w)，但其中可供植物吸收利用的磷僅佔 0.1%。傳統上，施用化學磷肥以避免作物缺磷，但施用的磷肥常易被固定於土壤中而降低其有效性，且過量施用磷肥亦產生環境汙染。因此，如何增進土壤中磷的有效性、促進作物產量及減少磷肥從土壤中損失的環境汙染是重要的研究議題。

土壤中可溶解無機磷或分解有機磷的微生物，可增加土壤中磷的有效性，增加植物的磷吸收量，此類微生物可稱為溶磷微生物 (phosphorus solubilizing microorganisms) (Sharma *et al*. 2013；Alori *et al*. 2017)。溶磷菌肥料為我國微生物肥料類之主要登記品目 (品目編號 8-03)，其溶磷活性乃分析單位體積 (重量) 之溶磷菌肥料，在單位時間內將難溶性含磷無機礦物 (磷酸鈣、磷酸鋁、磷酸鐵或磷礦石粉) 分解為水溶性磷之量，其尚未包含分解有機磷之微生物。澳洲對溶磷菌之檢

測已包含溶磷定量和磷酸酶活性的分析，以確保溶磷菌肥料之功效 (Deaker *et al*. 2011)。然而，培養時間和培養基之碳源是否影響溶磷活性之判讀則有待研究。

溶無機磷活性、溶磷圈測試、磷酸酶、有機酸分析及吲哚乙酸 (IAA) 常作為評估溶菌磷之促進作物磷吸收量之指標，唯國內溶磷菌肥料僅考量溶無機磷活性，其他溶磷能力指標是否可納入溶磷菌肥料溶磷活性之檢驗項目則需進一步研究。此外，某些溶磷菌可耐高鹽害土壤之環境，且能表現溶磷能力，有利於增加鹽鹼土的有效性磷，促進磷之吸收 (Zhu *et al*. 2011)。因此，土壤或作物接種溶磷菌是增加植物磷吸收量和降低化學磷肥施用量的可行策略之一。雖然溶磷菌可施用於土壤或根圈以促進磷的有效性，但有關土壤環境因子如何影響溶磷菌之功效的研究未臻完善。接種於土壤的溶磷菌可能隨時間而降低其族群密度 (Zeng *et al*. 2017)，故定期施用溶磷菌微生物以維持溶磷菌之溶磷功效可能有其必要性。再者，雖然螢光蛋白標定方法常用於追蹤特定溶磷菌 (Wang *et al*. 2017)，但有關如何定量土壤溶磷菌之族群則需進一步研究，以確定溶磷微生物是否可在土壤中生存。

一般測定溶磷活性之溶磷培養基碳源以葡萄糖為主，唯我國測定溶磷活性之培養基以蔗糖為碳源，但溶磷培養基之碳源可能影響溶磷菌的溶磷活性 (Nautiyal *et al*. 2000)。本研究主要探討培養基種類對溶磷活性和有機酸分泌的影響，並評估四種市售溶磷菌肥料對促進莧菜生長和磷吸收的效應。

材料與方法

一、溶磷菌之溶磷活性評估

(一) 供試菌株

本研究共使用 12 株菌株，包含為 *Bacillus*、*Microbacterium*、*Paenibacillus* 及 *Pseudomonas* 屬之微生物 (表 1)，其中以 *Bacillus* 為主要的溶磷菌，並為我國主要溶磷菌肥料所使用之菌種。

(二) 培養基

本研究所使用的培養基成分如表 2 所示，包含 NBRIP、Pikovskaya’s medium (PVK) 及我國溶磷菌分析法 AFS3183-1 所使用之培養基。三種培養基之主要差異為碳源，AFS3183-1 所使用之碳源為蔗糖，NBRIP 及 PVK 以葡萄糖為碳源。因此，

本研究亦將 AFS3183-1 所使用之蔗糖改為等量之葡萄糖，以評估同一培養基中不同碳源之差異，故本研究共使用四種培養基。

表 1. 本研究所使用之菌株

Strain	Species	Source
CHB 1065	*Bacillus aryabhattai*	This study
CHB 1107	*Pseudomonas grimontii*	This study
CHB 1122	*Pseudomonas libanensis*	This study
CHB 1128	*Bacillus marisflavi*	This study
CHB 1228	*Paenibacillus* sp.	This study
CHB 1257	*Bacillus subtilis*	This study
CHB 1264	*Microbacterium testaceum*	This study
CHB 1404	*Bacillus amyloliquefaciens*	This study
CHB 1285	*Bacillus subtilis*	Commercial phosphate solubilizing biofertilizer (PSB)1
CHB 1286	*Bacillus licheniformis*	Commercial PSB2
CHB 1287	*Bacillus safensis*	Commercial PSB3
CHB 1288	*Bacillus amyloliquefaciens*	Commercial PSB4

表 2. 本研究所使用之培養基及其組成

Component	PVK	NBRIP	AFS3183-1
	------------------------------------	g/L	--
Glucose	10	10	—
Sucrose	—	—	10
$Ca_3(PO_4)_2$	5	5	5
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	0.5	—
NH_4NO_3			0.27
NaCl	0.2	—	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	0.25	0.1
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	—	0.5	—
KCl	0.2	0.2	0.2
Yeast extract	0.5	—	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.002	—	0.001
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	—	0.001

(三) 菌株培養

於 250 mL 三角燒瓶中分別配製含 100 mL 之上述四種液體培養基，每 100 mL 含 0.5 g 之磷酸三鈣。將細菌培養於 NA 培養基上 28℃ 2 d，以無菌去離子水洗下菌落，將液體培養基接種 1 mL 含 10^8 CFU/mL 之菌落懸浮液，使液體培養基中之最終溶磷菌濃度為 10^6 CFU/mL。將培養基置於 28℃ 震盪培養 (200 rpm) 4 d 後，分析定溶液 pH 值變化、菌落數、可溶性磷含量、有機酸含量及種類。

(四) 培養基之 pH

將 5 mL 液體培養離心 (12000 x *g*) 以分離菌體，再以 pH 計測定上清液之 pH。

(五) 溶磷菌之菌數

取 1 mL 液體培養基以連續稀釋菌液，並取 100 μl 稀釋液塗抹於個別培養溶磷菌之固體溶磷菌培養基進行培養，培養後 2-4 d 計算菌落形成單位 (Colony-forming unit, CFU)。

(六) 溶液磷之分析

取 1 mL 液體培養基，以 0.45 μm 微濾膜過濾，濾液中的磷含量以鉬黃法測定 (AFS3183-1)，以分光光度計測定 420 nm 之吸光值。磷標準線以磷含量分別為 0、1、3、5、10、15、20 及 25 mg/L 所測得之吸收值而得。

(七) 有機酸之 HPLC 分析

取 1 mL 液體培養基，以 0.22 μm 微濾膜過濾至 HPLC 分析樣品瓶中。分析葡萄糖酸 (Gluconic acid) 及 2-酮戊二酸 (2-ketogluconic acid) 之樣品需先和乙腈以 1:1 (v/v) 比例混合再進行過濾，但含有蔗糖之培養基則不需混入乙腈。葡萄糖酸及 2-酮戊二酸之 HPLC 分析條件為: 以 Shodex NH_2 管柱、移動相為 3 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0) + 75% ACN (乙腈)、流速為 0.8 mL/min (0-10 min) 及 1.2 mL/min (10-25 min)、管柱溫度為 35℃及以 210 nm 為偵測波長。酒石酸 (Tartaric acid)、冰醋酸 (Acetic acid)、檸檬酸 (Citric acid)、蘋果酸 (Malic acid)、富馬酸 (Fumaric acid)、馬來酸 (Maleic acid)、甲酸 (Formic acid)、琥珀酸 (Succinic acid) 及草酸 (Oxalic acid)之分析條件為: 以 RPAQUEOUS-AR C30 管柱、移動相為 50 mM KH_2PO_4 (pH=2.8)、流速為 0.8 mL/min (0-10 min)及 1.2 mL/min (10-25 min)、管柱溫度為 30℃及以 210 nm 為偵測波長，上述 HPLC 分析以 Hitachi Chromaster 5110 進行之。

二、市售溶磷菌肥料之功效評估

(一) 供試土壤

本研究之供試土壤共兩種，包含鹼性和酸性土壤。鹼性土壤採自彰化縣大村鄉二林系土壤 (Eh4)，係為橄欖色至淡橄欖棕色，微鹼性粘板岩老沖積物沉積而成之含石灰結核，排水不完全沖積土。該土壤之 $pH_{1:1}$ 為 8.04，電導度為 0.55 dS/m (土:水 = 1:1)，有效性磷 (Olsen P) 為 47.0 mg/kg，交換性鉀為 72.0 mg/kg，交換性鈣為 1430 mg/kg，交換性鎂為 128 mg/kg。酸性土壤採自台中市龍井區陳厝寮系土壤 (CCe7)，其為由洪積層發育而成的紅棕色紅壤，該土壤之 $pH_{1:1}$ 為 4.55，電導度為 0.38 dS/m (土:水 = 1:1)，有效性磷 (Bray-1 P) 為 22.8 mg/kg，交換性鉀為 325 mg/kg，交換性鈣為 184 mg/kg，交換性鎂為 34.3 mg/kg。

(二) 供試市售溶磷菌肥料

鹼性土壤使用之商品化溶磷菌肥料 PSB2 和 PSB3，酸性土壤所使用之商品化溶磷菌肥料為 PSB1 和 PSB4，唯先前試驗顯示，陳厝寮系土壤種植莧菜不利其生長，即使添加溶磷菌亦生長不良，故該土壤預添加 1%禽畜糞堆肥 [牛糞、雞糞、豬糞、金針菇廢棄物和下腳料 (含粗糠、豬毛和雞毛) 之混合比例為 1:1:1:5:2 (w/w)] 以改善其土壤肥力和酸鹼值。

(三) 肥料處理

處理 A: 全量化肥 ($N:P_2O_5:K_2O$ = 150:105:135 kg/ha)

處理 B: 半量化學肥料 ($N:P_2O_5:K_2O$ = 75:52.5:67.5 kg/ha)

處理 C: 半量化學肥料 + PSB3 (鹼性土讓) 或 PSB1 (酸性土壤)

處理 D: 半量化學肥料 + PSB2 (鹼性土壤) 或 PSB4 (酸性土壤)

處理 E: 半量化學肥料 + 滅菌之 PSB3 或 PSB1

處理 F: 半量化學肥料 + 滅菌之 PSB2 或 PSB4

處理 G: 等量 PSB3 或 PSB1 之化學肥料

處理 H: 等量 PSB2 或 PSB4 之化學肥料

將上述肥料處理施用於盆栽土壤 (500 g) 中，並將水分含量調整至 60% 最大容水量，每週施用溶磷菌處理 (含滅菌處理)，稀釋 400 倍後每盆施用 50 mL，處理 G 和 H 亦同時施用等量化學肥料，以評估溶磷菌肥料中養分之效應。種植後一個月進行採收，分析其植株乾重和植體磷吸收量。

(四)植體養分磷含量分析

烘乾磨碎後之植體以硫酸和雙氧水於 250℃ 高溫爐中進行分解，分解液以鉬黃法測定磷含量 (Tan 1996)。

三、統計分析

調查數據以統計軟體 SAS (version 9.4; SAS Institute, Gary, NC, USA) 之 Proc Glimmix 進行分析，並依數據資料特性選擇合適之數學模式，並以 LSMEANS (least squared means) 指令進行處理平均間之比較 (α = 0.05) 進行特定處理或群組之比較。此外，溶磷活性與培養基 pH、菌數及有機酸之 Pearson 相關分析亦以 SAS 分析。

結果與討論

一、溶磷菌之溶磷活性評估

(一) 溶磷活性

供試 12 株菌中以 CHB 1107 培養於 AFS3183-1、葡萄糖為碳源之培養基之溶磷活性為最高 (7946 μg/mL/day)，且該菌株培養於 AFS3183-1 (葡萄糖) 之溶磷活性顯著高於培養於 AFS3183-1 (蔗糖)、NBRIP 及 PVK 培養基中，顯示培養基成分顯著影響溶磷菌之溶磷活性 (表 3)。然而，同屬 *Pseudomonas* 之 CHB 1122 培養於 PVK 培養基確有顯著較高之溶磷活性，顯示不同菌種在不同培養基之溶磷活性差異。整體而言，溶磷菌培養於 PVK 培養基之溶磷活性顯著高於培養於其他培養基者，其可能由於 PVK 培養基所含的養分較高有關，且僅此培養基含酵母抽出物。

(二) 培養基之 pH 變化

一般而言，培養基之 pH 與溶磷活性則呈負相關，當 pH 值越低時溶解磷酸三鈣的含量越高，例如 CHB 1107 和 CHB 1128 培養於 AFS3183-1 (葡萄糖) 之培養液 pH 顯著低於以碳源為蔗糖之相同培養基 AFS3183-1 (蔗糖) (表 3 和表 4)。培養基之 pH 與溶磷活性呈顯著負相關 ($r = -0.75$, $P < 0.0001$)，顯示酸性環境有助於培養基中磷酸三鈣之溶解 (Marra *et al*. 2015)。溶磷機制除了有機酸的鉗合作用以外，質子 (H^+) 的釋放導致培養基的酸化亦可能也是重要的溶磷因子之一 (Illmer & Schinner 1995)。除了有機酸可以貢獻 H^+ 外，對微生物而言，在生長及新陳代謝

的過程中也會產生無機酸，例如呼吸作用會產生二氧化碳，溶於水後產生碳酸。此外，微生物吸收 NH_4^+，細胞為了維持電中性也會釋出質子，導致周圍土壤或培養基的 pH 值下降。

表 3. 培養基對溶磷菌溶磷活性之影響

	Phosphate-solubilizing activity (µg/mL/day)			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
Strain	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	69.9fgB[z]	87.6fB	417eB	1071fA
1286	592deA	854cdA	848cdA	713fA
1287	473deB	617c-eB	511deB	2670eA
1288	197e-gB	309fB	540deB	973fA
1404	445d-gB	471d-eB	422deB	928fA
1264	695cdB	343fB	492deB	4001cA
1122	2831bC	2532aC	4981bB	5512aA
1107	7946aA	182fD	5541aB	4297cC
1065	731cdB	873cB	972cB	4919bA
1128	260e-gB	1003cA	1017cA	847fA
1228	1059cC	1589bB	1030cC	3399dA
1257	108fgB	75.8fB	362eB	848fA

[z] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher’s LSD at 5% probability.

表 4. 溶磷菌培養於不同培養基 4 d 後之培養基 pH

	pH			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
Strain	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	6.82aA[z]	6.87aA	6.01aB	5.38dC
1286	5.84cB	5.81fB	5.62dC	6.33aA
1287	6.23bA	5.84fB	5.70cdC	5.19eD
1288	6.76aA	6.81abA	5.79bcB	5.43cdC
1404	5.93cAB	5.99deA	5.85bB	5.45cdC
1264	5.61dB	5.85fA	5.44eC	4.80gD
1122	5.92cA	5.09hB	4.70fC	4.52iD
1107	4.65eC	5.93efA	4.65fC	5.69bB
1065	6.14bA	6.10cdA	5.44eB	4.66hC
1128	5.92cA	5.46gB	5.40eB	5.44cdB
1228	6.25bA	6.15cA	5.37eB	4.96fC
1257	6.70aA	6.73bA	5.88bB	5.53cC

[z] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher’s LSD at 5% probability.

(三)菌落數之變化

培養基種類和菌株間之交感效應呈顯著差異，顯示不同溶磷菌株之菌落數顯著受培養基種類之影響。雖然 CHB 1107 培養於 AFS3183-1 (葡萄糖) 有較高之溶磷活性，但培養四天後之培養基 pH 為 4.65，菌數卻僅為 10^4 CFU/mL，推測可能代謝物濃度過高對微生物生長產生毒害之故 (表 5)。相關分析結果顯示，菌落數與溶磷活性並無顯著相關 (-0.07, $P < 0.0001$)，例如 CHB 1122 培養於四種培養基之菌數都相對較高，但與培養於相同培養基之其他溶磷菌菌株相較，其溶磷活性並未全部顯著高於其他菌株。

(四)有機酸之分析

培養基種類顯著影響溶磷菌菌株分泌有機酸之種類和濃度，供試菌株分泌之有機酸濃度以 2-ketogluconic acid、gluconic acid 及 pyruvic acid 為較高，且此三種酸分泌之濃度與溶磷活性呈顯著相關，其中 2-ketogluconic acid 有最高之相關係數達 0.66 (表 6)。供試溶磷菌株分泌的 gluconic acid 皆低於 120 mg/l，培養基種類對大部分菌株分泌 gluconic acid 的影響無顯著差異，但 CHB 1122 和 CHB 1065 則

表 5. 溶磷菌培養於不同培養基 4 d 後之菌數

	Log (CFU/mL)			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
Strain	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	7.45efA[z]	7.62eA	7.10eB	5.00fC
1286	8.80bA	8.61bAB	7.75cC	8.52bB
1287	8.11dB	8.45bA	8.09bB	8.01cdB
1288	8.36cA	8.15cAB	7.36dC	8.12cB
1404	7.49efB	7.15fC	7.62cAB	7.82dA
1264	8.18cdB	8.20cB	8.01bB	9.62aA
1122	9.51aA	9.02aB	8.54aC	9.51aA
1107	4.00gD	8.89aB	8.11bC	9.41aA
1065	7.27fB	7.82deA	6.93eC	5.00fD
1128	4.00gB	7.03fA	6.95eA	4.00gB
1228	8.09dA	7.84deB	7.61cB	4.00gC
1257	7.53eA	8.00cdA	6.89eC	6.26eD

[z] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher’s LSD at 5% probability.

以培養於 Pikovskaya's medium 有較高之 gluconic acid 分泌量。然而，CHB 1264 培養於 AFS3183-1 (葡萄萄) 之 gluconic acid 分泌量顯著高於其它培養基處理 (表 7)。整體而言，溶磷活性較高之*Pseudomonas* spp.分泌的有機酸主要以2-ketogluconic acid為主，CHB 1107 培養於 AFS3183-1 (葡萄萄) 之 2-ketogluconic acid 分泌量高達 2259 mg/l，而 CHB 1122 培養於 Pikovskaya's medium 之 2-ketogluconic acid 分泌量 (1175 mg/l) 顯著高於培養於其它培養基處理 (表 8)。一般而言，供試溶磷菌菌株分泌 pyruvic acid 的量較少，溶磷活性較高之 CHB 1107 亦產生少量之 pyruvic acid，唯 CHB 1264、CHB 1128 及 CHB 1228 可產生高於 100 mg/l 之 pyruvic acid (表 9)。

表 6. 溶磷菌菌株分泌之有機酸種類與溶磷活性之相關分析

	Acetic acid	Citric acid	Formic acid	Gluconic acid	2-ketogluconic acid	Malic acid	Maleic acid	Pyruvic acid	Oxalic acid
r^z	-0.02	0.10	0.07	0.31	0.66	-0.15	0.06	0.30	-0.05
P	0.8051	0.2163	0.4234	0.0003	<0.0001	0.0686	0.4917	0.0003	0.5711

[z] Pearson's correlation coefficient was determined based on twelve phosphate-solubilizing bacteria evaluated.

表 7. 溶磷菌培養於不同培養基 4 d 後之葡萄糖酸 (gluconic acid) 含量

Strain	Gluconic acid (mg/l)			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	0.23cA[y]	ND[z]	0.32dA	0.13bA
1286	ND	0.03bA	2.53dA	0.14bA
1287	1.08cA	5.94bA	0.34dA	21.7bA
1288	8.53cA	0.95bA	11.4cdA	0.37bA
1404	1.37cA	ND	9.56cdA	2.03bA
1264	95.2aA	0.45bB	0.06dB	0.03bB
1122	2.53cC	63.4aB	50.7abB	108aA
1107	ND	1.48bB	36.7bcA	0.07bB
1065	22.2bcC	ND	70.8aB	116aA
1128	52.0bAB	25.5bB	22.5b-dB	83.4aA
1228	9.93cA	0.10bA	ND	ND
1257	19.0cA	3.52bA	ND	16.0bA

[y] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher's LSD at 5% probability.

[z] ND = not detected.

表 8. 溶磷菌培養於不同培養基 4 d 後之 2-酮戊二酸 (2-ketogluconic acid) 含量

	2-ketogluconic acid (mg/L)			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
Strain	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	ND	ND	0.76bA	1.93bA
1286	85.9cA	26.2bA	7.02bA	28.5bA
1287	33.4cA	1.97bA	2.90bA	4.57bA
1288	0.21cA	4.92bA	3.67bA	0.31bA
1404	6.53cA	ND	2.93bA	0.63bA
1264	249cA	7.80bA	0.33bA	0.03bA
1122	995bAB	788aB	365aC	1175aA
1107	2259aA	65.1bC	79.0abC	1254aB
1065	0.13cA[y]	ND[z]	ND	0.27bA
1128	ND	0.03bA	0.47bA	7.18bA
1228	ND	ND	ND	ND
1257	19.7cA	12.6bA	173abA	ND

[y] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher's LSD at 5% probability.

[z] ND = not detected.

表 9. 溶磷菌培養於不同培養基 4 d 後之丙酮酸 (pyruvic acid) 含量

	Pyruvic acid (mg/l)			
	Culture medium			
	AFS3183-1			
Strain	Glucose	Sucrose	NBRIP	Pikovskaya
1285	7.21bA[y]	0.32aA	6.24dA	0.31bA
1286	0.72bA	4.47aA	0.98dA	0.44bA
1287	1.01bA	1.32aA	3.70dA	11.2bA
1288	8.13bA	1.05aB	42.2cA	2.69bB
1404	0.87bA	6.11aA	2.93dA	0.62bA
1264	215aA	25.2aC	177bB	12.9bC
1122	0.03bB	9.90aB	151bA	0.13bB
1107	7.72bB	2.42aB	453aA	0.08bB
1065	6.91bA	2.78aA	14.7cdA	0.01bA
1128	11.1bB	29.9aB	175bA	30.8bB
1228	1.20bB	2.62aB	10.5cdB	645aA
1257	1.75bA	1.13aA	3.57dA	ND[z]

[y] Means followed by the same uppercase letter within a row or lowercase letter within a column are not significantly different according to Fisher's LSD at 5% probability.

[z] ND = not detected.

二、盆栽試驗

(一) 二林系土壤 (鹼性土壤)

1. 株高

除等量 PSB3 化學肥料 (處理 H) 外，半量化學肥料+PSB3 (處理 C) 和半量化學肥料+滅菌 PSB3 (處理 E) 之莧菜株高皆顯著高於其他處理，顯示該溶磷菌肥料中的養分顯著影響株高。此外，半量化學肥料+PSB2 (處理 D)、半量化學肥料+滅菌之 PSB2 (處理 F) 和等量 PSB2 化學肥料處理 (處理 I) 之株高並未顯著高於半量化學肥料 (處理 B) 和不施肥處理 (處理 G)，顯示 PSB2 之溶磷菌和養分皆未能顯著影響株高 (圖 1)。

2. 莧菜植株乾重

半量化學肥料+PSB3 和半量化學肥料+滅菌 PSB3 之莧菜植株乾重皆顯著高於其他處理，兩種處理之植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 125-140%。然而，等量 PSB3 化學肥料處理之植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 83.6%，顯示該溶磷菌肥料中所含養分的效應遠大於溶磷菌本身促進

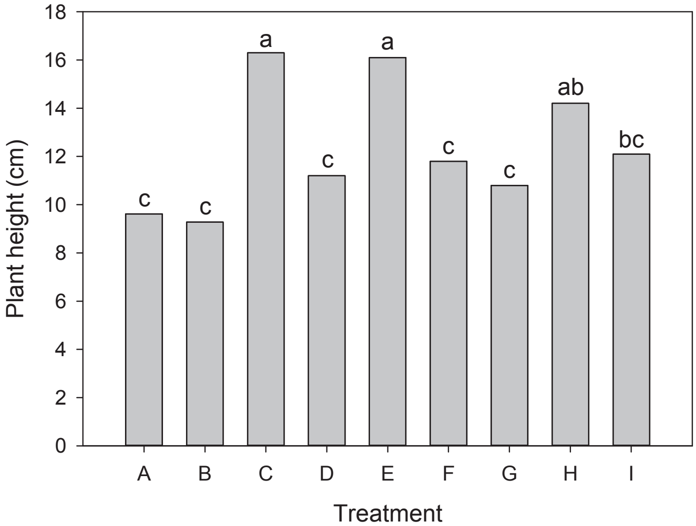

圖 1. 二林系土壤 (鹼性土壤) 施用溶磷菌肥料對莧菜株高的影響。A = 全量化學肥料; B = 半量化學肥料; C = 半量化學肥料+PSB3; D = 半量化學肥料+PSB2; E = 半量化學肥料+滅菌之 PSB3; F = 半量化學肥料+滅菌之 PSB2; G = 不施肥; H = 等量 PSB3 化學肥料; I =等量 PSB2 化學肥料。

植株生長之效應。相反的，半量化學肥料+PSB2 和半量化學肥料+滅菌 PSB2 並未顯著促進植株生長。此外，等量 PSB2 化學肥料處理 (處理 I) 之植株乾重亦未顯著高於半量化學肥料者，故該溶磷菌肥料並未能顯著促進作物生長 (圖 2)。

3. 植體磷吸收量

半量化學肥料+PSB3 處理之莧菜植株磷吸收量皆顯著高於其他處理，但與半量化學肥料+滅菌 PSB3 處理未達顯著。半量化學肥料+PSB3 處理和半量化學肥料+滅菌 PSB3 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料者達 54.8-73.9%。然而，等量 PSB3 化學肥料處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料者達 41.0%，顯示該溶磷菌肥料中所含的磷肥可能為顯著增加植株磷吸收量之主要原因。再者，半量化學肥料+PSB2 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料+滅菌之 PSB2 達 38.0%，且等量 PSB2 化學肥料之植株磷吸收量並未顯著高於半量化學肥料+滅菌之 PSB2，顯示該溶磷菌肥料可顯著增加莧菜之磷吸收量 (圖 3)。

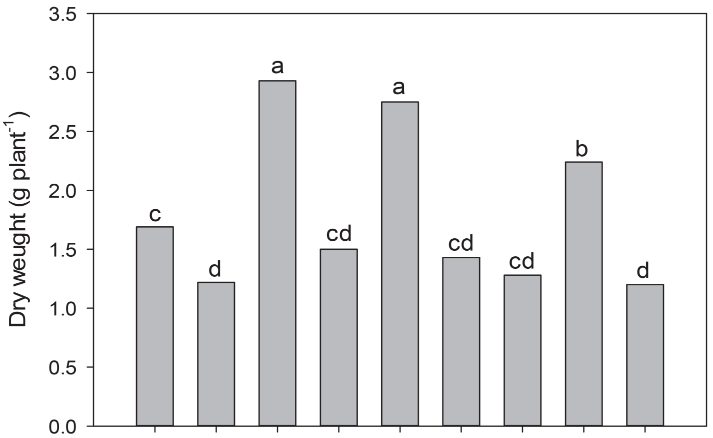

圖 2. 二林系土壤 (鹼性土壤) 施用溶磷菌肥料對植株乾重的影響。A＝ 全量化學肥料; B＝ 半量化學肥料; C ＝ 半量化學肥料+PSB3; D ＝ 半量化學肥料+PSB2; E ＝ 半量化學肥料+滅菌之 PSB3; F＝ 半量化學肥料+滅菌之 PSB2; G＝ 不施肥; H＝ 等量 PSB3 化學肥料; I＝等量 PSB2 化學肥料。

(二)陳厝寮系土壤 (酸性土壤)

1.株高

與半量化學肥料相較，陳厝寮系土壤施用 PSB1 或 PSB4 並未顯著增加莧菜株高，且兩者之滅菌處理或等量化學肥料處理亦未能顯著增加植株，顯示前述兩種溶磷菌微生物肥料之溶磷菌及其中所含養分皆未能顯著影響株高 (圖 4)。

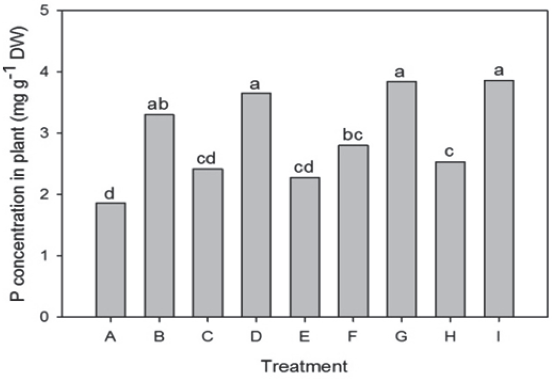

圖 3. 二林系土壤 (鹼性土壤) 施用溶磷菌肥料對莧菜植株磷吸收量的影響。A = 全量化學肥料; B = 半量化學肥料; C = 半量化學肥料+PSB3; D = 半量化學肥料+PSB2; E = 半量化學肥料+滅菌之 PSB3; F = 半量化學肥料+滅菌之 PSB2; G = 不施肥; H = 等量 PSB3 化學肥料; I =等量 PSB2 化學肥料。

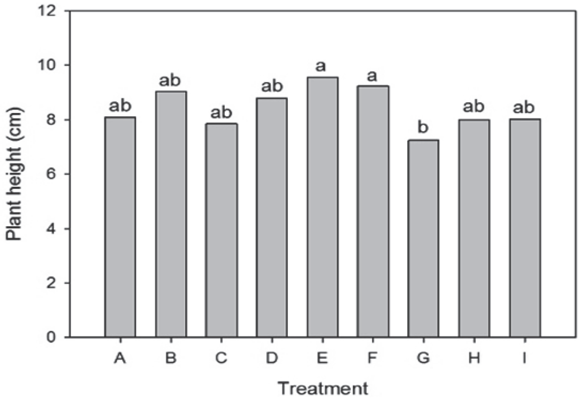

圖 4. 陳厝寮系土壤 (酸性土壤) 施用溶磷菌肥料對莧菜株高的影響。A = 全量化學肥料; B = 半量化學肥料; C = 半量化學肥料+PSB1; D = 半量化學肥料+PSB4; E = 半量化學肥料+滅菌之 PSB1; F = 半量化學肥料+滅菌之 PSB4; G = 不施肥; H = 等量 PSB1 化學肥料; I =等量 PSB4 化學肥料。

2.莧菜植株乾重

與半量化學肥料相較，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB1 顯著降低莧菜植株乾重 (圖 5)。然而，兩種溶磷菌肥料之滅菌處理卻未顯著降低植株乾重，故推測可能陳厝寮系土壤添加 1% 禽畜糞堆肥後增加其養分有效性，而施用溶磷菌肥料可能造成微生物與植物根部競爭養分吸收，導致莧菜植株生長不良。

3. 植體磷吸收量

與半量化學肥料相較，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB4 皆未能顯著增加磷吸收量。然而，滅菌之 PSB1 和滅菌之 PSB4 皆較未滅菌處理可顯著增加莧菜植株之磷吸收量。PSB1 之原料為 *B. subtilis* 和糊精，而 PSB4 之原料含 *B. amyloliquefacien*s、大豆蛋白、乳糖、糖蜜及水，推測溶磷菌肥料 PSB1 和 PSB4 滅菌後所釋出之養分可能誘導土壤微生物活性，並提高土壤有效性磷，進而促進莧菜根部之磷吸收量。此外，等量 PSB1 和等量 PSB4 化學肥料處理之植株磷吸收量皆顯著高於半量化學肥料+個別微生物肥料處理，顯示酸性土壤接種溶磷菌肥料可能有不利作物生長之虞 (圖 6)。

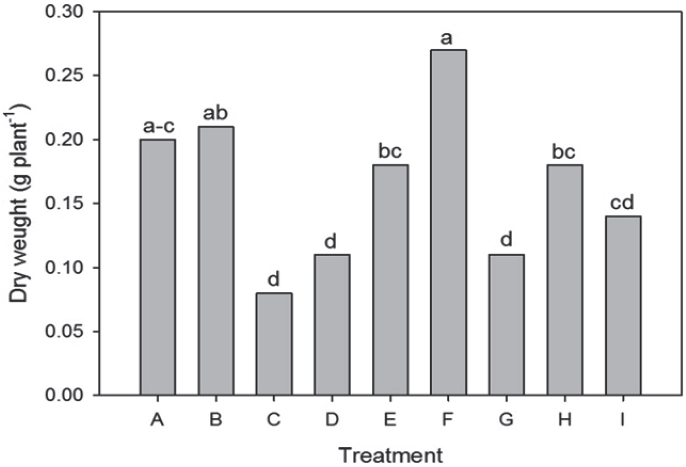

圖 5. 陳厝寮系土壤 (酸性土壤) 施用溶磷菌肥料對莧菜乾重的影響。A = 全量化學肥料; B = 半量化學肥料; C = 半量化學肥料+PSB1; D = 半量化學肥料+PSB4; E = 半量化學肥料+滅菌之 PSB1; F = 半量化學肥料+滅菌之 PSB4; G = 不施肥; H = 等量 PSB1 化學肥料; I =等量 PSB4 化學肥料。

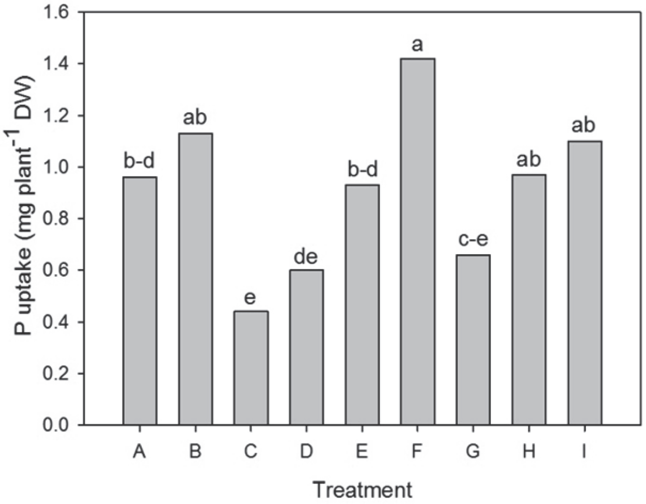

圖 6. 陳厝寮系土壤 (酸性土壤) 施用溶磷菌肥料對莧菜植株磷吸收量的影響。A= 全量化學肥料; B = 半量化學肥料; C = 半量化學肥料+PSB1; D = 半量化學肥料+PSB4; E = 半量化學肥料+滅菌之 PSB1; F = 半量化學肥料+滅菌之 PSB4; G = 不施肥; H = 等量 PSB1 化學肥料; I =等量 PSB4 化學肥料。

結論

本研究顯示，培養基種類顯著影響溶磷菌之溶磷活性，供試菌株中以 *Pseudomonas grimontii* CHB 1107 之溶磷活性為最高，其培養於 AFS3183-1 以葡萄糖為碳源之溶磷活性達 7946 μg/mL/day。整體而言，溶磷菌培養於 PVK 培養基之溶磷活性顯著高於培養於其他培養基者，其可能由於 PVK 培養基所含的養分較高有關，且僅此培養基含酵母抽出物。培養基之 pH 與溶磷活性呈顯著負相關 ($r = -0.75$, $P < 0.0001$)，顯示酸性環境有助於培養基中磷酸三鈣之溶解。培養基種類顯著影響溶磷菌菌株分泌有機酸種類和濃度，分泌之有機酸濃度以 2-ketogluconic acid、gluconic acid 及 pyruvic acid 為較高，且此三種酸分泌之濃度與溶磷活性呈顯著負相關，其中 2-ketogluconic acid 有最高之相關係數達 0.66。盆栽試驗顯示，半量化學肥料+PSB3 和半量化學肥料+滅菌 PSB3 之莧菜植株乾重皆顯著高於其他處理，兩種處理之植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 125-140%。然而，等量 PSB3 化學肥料處理之植株乾重顯著高於半量化學肥料者達 83.6%，顯示該溶磷菌肥料中

所含養分的效應遠大於溶磷菌本身促進植株生長之效應。相反的，半量化學肥料+PSB2和半量化學肥料+滅菌之PSB2並未顯著促進植株生長。半量化學肥料+PSB3之莧菜植株磷吸收量皆顯著高於其他處理，但與半量化學肥料+滅菌 PSB3 處理並未達顯著。半量化學肥料+PSB3 處理和半量化學肥料+滅菌 PSB3 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料者達 54.8-73.9%，但等量 PSB3 化學肥料處理之植株磷吸收量亦顯著高於半量化學肥料者達 41.0%，顯示該溶磷菌肥料中所含的磷肥可能為顯著增加植株磷吸收量之主要原因。然而，半量化學肥料+PSB2 處理之植株磷吸收量顯著高於半量化學肥料+滅菌之 PSB2 達 38.0%，且等量 PSB2 化學肥料之植株磷吸收量並未顯著高於半量化學肥料+滅菌之 PSB2，顯示該溶磷菌肥料可顯著增加植株磷吸收量。與半量化學肥料相較，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB4 顯著降低莧菜植株乾重。此外，酸性土壤施用半量化學肥料+PSB1 或半量化學肥料+PSB4 皆未能顯著增加磷吸收量，顯示酸性土壤施用溶磷菌肥料促進莧菜生長和磷吸收之效益較低。本研究發現培養基種類影響溶磷菌之溶磷活性分析，且商品化溶磷菌功效不一，而原料中養分可能顯著影響其肥功效。

引用文獻

1. Alori, E.T., B.R. Glick, and O.O. Babalola. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. Front. Microbiol. 8: 971.
2. Illmer, P., and F. Schinner. 1995. Solubilization of inorganiccalcium phosphate-solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27: 257–263.
3. Marra, L.M., S.M. de Oliveira-Longatti, C.R.F.S. Soares, J.M. de Lima, F.L. Olivares, and F.M.S. Moreira. 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Braz. J. Microbiol. 46: 367–365.
4. Nautiyal, C.S., S. Bhadauria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal, and D. Verma. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiol. Lett. 182: 291–296.
5. Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils.

Springerplus 2: 587.

6. Wang, Z., G.Y. Xu, P.D. Ma, Y.B. Lin, X.N. Yang, and C.L. Cao. 2017. Isolation and characterization of a phosphorus-solubilizing bacterium from rhizosphere soils and its colonization of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). Front. Microbiol. 8: 1270.
7. Zeng, Q.W., X.Q. Wu, and X.Y. Wen. 2017. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. Ann. Microbiol. 67: 219–230.
8. Zhu, F.L., L.Y. Qu, X.G. Hong, and X.Q. Sun. 2011. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011: 615032.

Evaluation of Phosphate-solubilizing Efficiency Characters of Phosphate-solubilizing Bacteria

Yu-Syuan Hsu[1], Cheng-Hua Huang[2,*]

Summary

Phosphate fertilization is an important factor to influence crop yields. It has been suggested that inoculation of crops with phosphate-solubilizing bacteria (PSB) can enhance phosphate uptake, and thus commercialized products of PSB are increasingly available for growers. The purposes of this study were to evaluate the effects of culture media on phosphate-solubilizing activity and organic acids produced and to determine the efficiency of four commercial phosphate-solubilizing (PS) biofertilziers. Twelve PSB strains and four culture media including AFS3183-1 (glucose or sucrose as sole carbon source), NBRIP, and Pikovskaya's medium (PVK) were used to evaluate their effects on PS activity, medium pH, PSB colonies, and organic acids secreted by PSB. In order to evaluate the effect of four commercial PS biofertilizers on the growth and P uptake of amaranth plants (*Amaranthus mangostanus* L.), commercial PSB2 and PSB3 were applied into an alkaline soil and the other two commercial PSB1 and PSB1 were used in an acid soil. Culture media significantly affected phosphate-solubilizing activities of PSB, and *Pseudomonas grimontii* CHB 1107 showed a significantly high level of PS activity up to 7946 μg/mL/day. In general, PSB cultured in PVK resulted in a higher level of PS activity partly because of this medium containing yeast extract. There was a significantly negative correlation between medium pH and PS activity (r = -0.75, P < 0.0001), suggesting acidic conditions helpful for solubilizing tricalcium phosphate. In addition, culture media significantly affected the concentration of organic

[*] Corresponding author, e-mail: chhuang@nchu.edu.tw

[1] Graduate Student, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Associate Professor, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

acids secreted by PSB. Of these organic acids, the concentration of 2-ketogluconic acid, gluconic acid, and pyruvic acid were the highest. PS activity was significantly correlated with the concentration of these three organic acids, with the highest Pearson correlation coefficient of -0.66 for 2-ketogluconic acid. Compared with half the recommended rate of chemical fertilizers, the alkaline soil applied with half the recommended rate of chemical fertilizers with non-sterilized or sterilized PSB3 resulted in a significant increase in dry weight by 125-140%. However, the chemical fertilizer treatment equal to the nutrient content in PSB3 also significantly increased dry weight by 83.6%, suggesting that the nutrients rather than PSB in PSB3 might significantly improve amaranth growth. In contrast, half the recommended rate of chemical fertilizers with non-sterilized or sterilized PSB2 did not significantly improve amaranth growth. The alkaline soil applied with half the recommended rate of chemical fertilizers with non-sterilized or sterilized PSB3 significantly increased P uptake of amaranth by 54.8-73.9% in comparison with half the recommended rate alone. However, the chemical fertilizer treatment equal to the nutrient content in PSB3 also significantly increased P uptake of amaranth up to 41.0%, suggesting that phosphate fertilization rather than PSB in PSB3 might significantly increase P uptake of amaranth. Conversely, half the recommended rate of chemical fertilizers with non-sterilized PSB2 significantly increased P uptake of amaranth by 38.0% compared to half the recommended rate with sterilized PSB2, suggesting that PSB in PSB2 could improve P uptake by amaranth roots. Compared with half the recommended rate of chemical fertilizers alone, the acid soil applied with half the recommended rate of chemical fertilizers with non-sterilized PSB1 or PSB4 significantly reduced dry weight of amaranth and did not increase P uptake of amaranth, suggesting a low efficiency of PSB in the acid soil. In conclusion, media used for culturing PSB affect PS activity, and commercial PSB vary in improving P uptake and plant growth. Moreover, the nutrients in these commercial biofertilizers may considerably affect nutrient uptake and growth of plants.

Keywords: Phosphate fertilizer, Phosphate-solubilizing bacteria, Biofertilizer.